



TITLE:

Rhein anthroneの瀉下作用機序に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

八木, 照世

CITATION:

八木, 照世. Rhein anthroneの瀉下作用機序に関する研究. 京都大学, 1991, 薬学博士

ISSUE DATE:

1991-06-29

URL:

<https://doi.org/10.11501/3057484>

RIGHT:

Rhein anthroneの瀉下作用機序に関する研究

1991

八 木 照 世

目次

緒論	1
第1章 マウスにおけるrhein anthroneの瀉下作用とその作用機序	5
第1節 盲腸内投与したrhein anthroneの瀉下活性	5
第2節 Rhein anthroneの瀉下作用に及ぼすprostaglandin E ₂ 拮抗薬 及びindomethacinの効果	11
第3節 大腸組織内PGE様物質生成に及ぼすrhein anthroneの効果	16
第4節 大腸組織内で生成促進するPGの同定	22
第5節 大腸内輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果	29
第6節 結腸内腔液量及び結腸内Na ⁺ 、K ⁺ 膜輸送に及ぼすrhein anthrone 並びにindomethacinの効果	32
第7節 結腸内粘液分泌に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの 効果	39
第8節 結腸内粘液生合成に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacin の効果	42
第9節 小括	45
第2章 ラットにおけるrhein anthroneの瀉下作用とその作用機序	46
第1節 盲腸内投与したrhein anthroneの瀉下活性	46
第2節 Rhein anthroneの瀉下作用に及ぼすindomethacinの効果	48
第3節 大腸組織内PGE様物質生成に及ぼすrhein anthroneの効果	51

第4節	大腸内輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果	53
第5節	結腸内腔液量及び結腸内Na ⁺ 、K ⁺ 膜輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果	56
第6節	結腸内粘液分泌に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果	61
第7節	小括	63
第3章	総括	65
謝辞		67
発表論文目録		68
参考文献		69

緒論

世界的に広く緩下剤として用いられているセンナ、大黃の共通主瀉下成分の sennoside A は、天然のプロドラッグの一種で、かつて多くの研究者が推定したように本来の配糖体の形で作用するのではなく、経口投与後ほとんど分解吸収されずに消化管経由で大腸に到達し、主として腸内菌の作用により加水分解されて sennidin A となった後、還元されて真の活性代謝物質の rhein anthrone となり、そこで瀉下作用を発現するという事実を佐々木ら¹⁾ はマウスを用いた実験で明らかにしている。

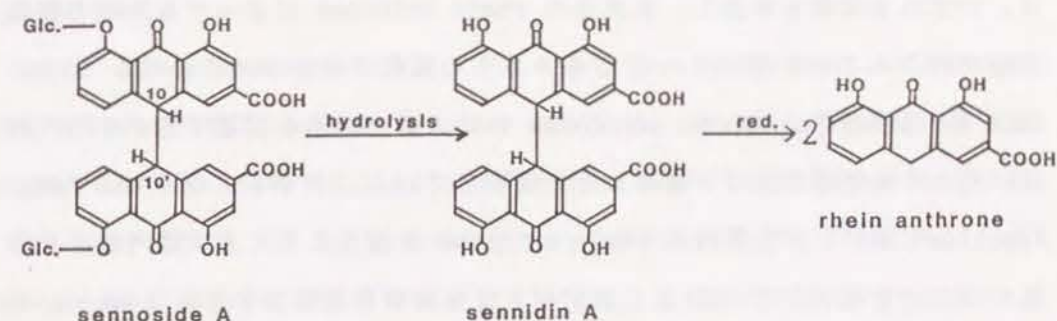


Fig. 1 Metabolic pathway of sennoside A in the mouse and rat large intestine

ラットについては Dreessen ら²⁾ により in vitro の実験において通常ラットの盲腸内容物と sennoside A 及び B を incubate したところ、sennidin A

及び B、引き続いて rhein anthrone に代謝・分解されるのに対し、無菌ラットでは盲腸内容物と sennoside A 及び B を incubate しても代謝・分解されないことから、ラットにおいても sennoside A 及び B は腸内菌の作用で代謝・分解され rhein anthrone を生じることが示された。また、桑野らはラットにおいてもマウスと同様に腸内菌の作用で生成する rhein anthrone が sennoside A の最終活性代謝物質であることを明らかにしている³⁾。

一般に瀉下作用の発現は腸管運動ならびに腸管内腔液量の変化に起因すると考えられているが、rhein anthrone の作用については Hardcastle ら⁴⁾ がヒトの結腸運動をバルーン法で描記する実験で、センナエキスを直接結腸内に注入しても蠕動は促進されないが、エキスと糞便を incubate したものはエキスと糞便から分離した大腸菌の培養液とを incubate したものを注入したときは、いずれも蠕動を促進し、合成品の rhein anthrone によっても同様の蠕動運動が起こることを示している。佐々木らの研究ではマウスにおける sennoside A の作用機序について、sennoside A は大腸内輸送を促進するが小腸内輸送に対しては影響を及ぼさないことを証明している。ラットについては Leng-Peschlow (1986)⁵⁾ が盲腸内に rhein anthrone を投与したとき大腸内輸送を促進することを報告している。これに対して水貯留作用について、Lemmens ら (1974⁶⁾、1976⁷⁾ は rhein anthrone ならびに rhein がラット結腸において同程度に水及び Na⁺ の吸収を促進するが、sennoside 類にはそのような効果はまったく認められないと報告している。これらの成績は腸管運動や腸管内腔液量の変化について断片的に調べられたものであって、瀉下作用との直接の関連を明らかにしたものではない。

一方、油脂性下剤のヒマシ油によるラットの下痢が、PG 生合成阻害薬である各種の非ステロイド性抗炎症薬である程度抑制される事実^{8) 9)}、aloin や phenolphthalein がラット結腸内 PGE 様物質生合成を促進する事実^{10) 11)} さらに

ヒマシ油の作用物質 ricinoleic acid¹²⁾ 又は bisacodil、phenolphthalein¹³⁾ のようなフェノール性下剤による結腸の水分泌が prostaglandin (PG) 生合成阻害薬の indomethacin の皮下注射によって抑制されるとともに PGE の放出も抑制されるという事実など、膨張性下剤を除く各種下剤の瀉下作用発現に PG が関与する可能性が示唆されている。Sennoside A 及び B (Beubler & Juan 1979)¹²⁾、センナポッド抽出物 (Beubler & Kollar 1985)¹⁴⁾、センナ錠 (Cohen 1982)¹⁵⁾、センナ (Capasso et al 1986)¹⁶⁾ がラット結腸内 PGE 様物質生成を促進し、これが瀉下作用に関与する可能性が示された。しかし、下痢発現時に PGE 様物質の生成が促進されているか否か、及び、この生成促進が indomethacin 等 PG 生合成阻害薬で抑制された時に瀉下作用も抑制されるか否かは明らかにされておらず、PG 生成促進と瀉下作用発現との対応は明確には証明されていない。

また、indomethacin がセンナポッドエキスのラット結腸における水及び電解質分泌作用を抑制し (Beubler & Koller 1985)¹⁴⁾、sennoside の大腸内輸送促進作用を部分的に抑制すること (Leng-Peschlow 1986)⁵⁾ など sennoside 類の瀉下作用機序として、PG 類との関係を示すいくつかの報告がある。しかし、これらの PG に関連する報告も下痢現象との関連を直接証明するものではなく、瀉下作用機序は十分に解明されていない。

したがって、sennoside A の最終活性代謝物質である rhein anthrone の作用部位である大腸において瀉下作用機序を追究することは sennoside A の瀉下作用発現を解明するだけでなく、センナ、大黃の臨床応用に寄与するところが大きいと考えられる。

本研究では、瀉下作用の検定に一般的に用いられているが、種差のある可能性も示唆されているマウス及びラットを用いて rhein anthrone を盲腸内に導管を通じて直接投与し、作用部位の大腸においてその瀉下作用を調べ、PG の

関与を中心に作用機序を検討した。

その結果、マウスにおける rhein anthrone の瀉下作用機序は主として結腸内 PGE_2 の生成及び放出促進を介した大腸内輸送促進と結腸内粘液生合成・分泌促進を中心とした結腸内腔液貯留であるが、ラットにおいては瀉下発現の要因である大腸内輸送促進、結腸内腔液貯留いずれにおいても PGE_2 の介在は部分的で他の作用機序も関与すると結論し、両動物間には rhein anthrone の瀉下作用機序における PGE_2 の寄与の程度に種差のあることが明らかになった。

第1章 マウスにおける rhein anthrone の瀉下作用とその作用機序

第1節 盲腸内投与した rhein anthrone の瀉下活性

Rhein anthrone は大腸において sennoside A より代謝生成されることが明らかになっている¹⁾ので、マウスに盲腸内導管手術¹⁷⁾を施し、導管を通して作用部位の大腸に rhein anthrone を直接投与し、瀉下作用を調べた。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

1) 原料 rhein の調製

Sennoside A 粉末(日本粉末薬品) 1 g を 5 % NaHCO_3 溶液 40 ml に溶解し、15 % H_2O_2 溶液 40 ml を加えて水浴上で2時間加熱還流した後、10 % HCl 50 ml を加えて更に1時間加熱還流した。冷後、ether 100 ml で2回抽出し、水層中の不溶物は水層を除いた後更に ether 100 ml で1回抽出し、先の ether 抽出物と合わせて同量の水で洗浄後、ether を留去し、粗 rhein を得た。これを少量の pyridine で洗浄後、pyridine で 4 ~ 5 回、acetic acid で 1 ~ 2 回再結晶し、更に少量の ethanol で洗浄後橙黄色粉末約 25 mg を得た。本品は mp 315 ~ 320 °C である(文献 mp 320 °C¹⁸⁾)。

2) rhein anthrone の調製

Auterhoff らの方法¹⁸⁾により rhein から調製した。rhein 100 mg を acetic acid 40 ml に溶解し、油浴中(120 ~ 130 °C)で還流下 40 % $\text{SnCl}_2\text{-HCl}$

溶液 20 ml を 2 時間にわたって滴加した。更に 1 時間加熱還流し、冷後析出した黄色結晶をろ取し、acetic acid で再結晶して黄色針状結晶約 50 mg を得た(収率 53 %)。

本品を 0.1 % p-nitrosodimethylaniline-pyridine 溶液¹⁹⁾と反応させると緑色を呈する。これを試料溶液として、silicagel の薄層板(Merck社 Silica-gel 60 No 5721) 及び展開溶媒(ethyl acetate-methanol-H₂O 100:17:13)を用いた薄層クロマトグラフィー²⁰⁾を行うと Rf 値 0.7 に緑色のスポットを認めた。

本品は mp 266 ~ 270 °C (decomp.) (mp 文献 288°C¹⁸⁾) UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 264 (4.15)、290 (4.08)、364 (3.99)、IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 2800 ~ 3200 (OH)、1710 (COOH)、1656 (CO)、Anal. Calcd. for C₁₅H₁₀O₅: C, 66.67; H, 3.73、Found: C, 66.48; H, 3.63。

これらのデータは文献¹⁸⁾ 記載のデータとよく一致すること、及び薄層クロマトグラフィーの結果より本品を rhein anthrone であると確認した。

融点は MP-21 (ヤマト科学)、IR スペクトルは DS-301 Infrared spectrophotometer (日本分光) 及び IR-420 Spectrophotometer (島津製作所)、UV スペクトルは 323 Recording spectrophotometer (日立製作所) を用いて測定した。

2. 試薬

(1) prostaglandin E₂ (フナコシ)

3. 試料液などの調製

Rhein anthrone は 2 % NaHCO₃ 溶液に投与直前に溶解した。PGE₂ は 0.1 ml

の ethanol に溶解し、0.18 ml の 0.1 % NaHCO₃ 溶液を加え、精製水で 5 ml に希釈した。なお、これらの vehicle 溶液を盲腸内投与しても瀉下作用は全く認められなかった。

II. 実験動物

マウスは Jcl:ICR 雌性、体重 25 ~ 35 g (日本クレア) を用いた。動物は、固形飼料 (MF、オリエンタル酵母) で飼育し、飼育及び実験は 22 ~ 25 °C の部屋で行った。

III. 瀉下試験

ステンレス製のバットの上に濾紙を敷き、その上 2.5 cm のところに 1 匹ずつ隔離できるステンレス金網製のケージをのせてマウスを入れ、実験中も水及び飼料は自由に与えた。

1. 盲腸内導管手術¹⁷⁾

マウスを sodium pentobarbital (Pitman Moore、1.6 ~ 2.2 mg/匹、腹腔内注射) で麻酔し、腹部を正中線に沿って切開し、盲腸先端部を腹腔外に取り出し、できるだけ小さく切開して切開口より外径約 1 mm のポリエチレン細管 (ヒビキ本舗、Fr. No. 3) を盲腸内に約 1 cm 挿入し、切開部で結紮後、腹腔内におさめた。ポリエチレン細管の他端は皮下を通して背部の頸部近くまで導き、背部皮下を貫通して体外へ 1.5 cm 程度露出した。開腹部の腹筋と皮膚はそれぞれ縫合結紮し、さらに背部のポリエチレン細管貫通部で皮膚と縫合し、ポリエチレン細管を固定した (Fig. 2)。実験には手術後 3 日以降のマウスを用いた。

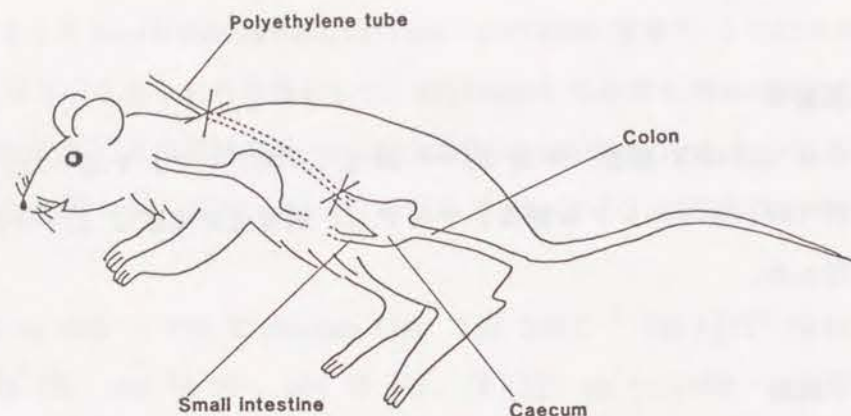


Fig. 2 Intracaecal cannula

2. 試料投与方法

試料投与は注射器を用いてポリエチレン細管（導管）内にまず水を 0.05 ml / 匹注入し、導管が通じていることを確かめた後、試料を 5 ml/kg 体重注入し、更に導管内に残っている試料液が完全に注入されるよう水 0.05 ml / 匹を注入した。

3. 下痢の判定方法

マウスの糞便は通常金網から下の濾紙上に落ちる。正常なマウスの糞便は濾紙上にしみを付けないが、水分の多い糞便の場合には濾紙にしみがつくのでこの便を下痢便とみなし、下痢陽性と判断した。観察は試料投与後 6 時間行った。

4. 瀉下活性

瀉下活性は次のように表わした。

(1) 瀉下率

試料投与 6 時間以内の下痢陽性動物数 / 実験動物数

(2) 瀉下作用発現所要時間

試料投与後、下痢便が初めて排泄されるまでの時間を測定し、cut off time を 6 時間として平均値 ± 標準誤差で表わした。

(3) 下痢の強度

排泄された糞便の状態を 0 ~ 4 の 5 段階にスコア化した²¹⁾。

0 = 排便なし、もしくは濾紙にしみを付けない正常便。

1 = 濾紙の裏面からしみが確認できる膨潤便。

2 = 便の周囲の濾紙にしみがつくような軟便。

3 = 便の形がない泥状便。

4 = 粘液便。

[結果及び考察]

Table 1 に示すように、rhein anthroneを導管を通じて盲腸内に直接投与すると、用量依存的に作用が増強し、sennoside A/B 10 mg/kg に相当する 6.24 mg/kg 以上の投与量でほとんど全例のマウスに投与後約 20 分で特徴的な粘液性下痢を誘発した。Rhein anthrone による下痢は一過性で、瀉下効果は 1 ~ 2 時間持続した。

各種下剤の瀉下作用発現に PGE 類の生成及び放出が関与することが示唆されているので比較実験として、PGE₂ を rhein anthrone と同様にマウス盲腸内に投与すると、0.2 mg/kg の投与量で rhein anthrone 6.24 mg/kg によって誘発される下痢と同程度の粘液性下痢を誘発した。

したがって、rhein anthrone のマウスにおける瀉下作用発現には PG 類の関与する可能性が考えられる。

Table 1 Purgative activity of rhein anthrone administered intracaecally

Dose (mg/kg)	Incidence of diarrhoea*	Mean diarrhoea score	Time to onset of diarrhoea (min) mean \pm s.e.
1.56	0/9	0	360
3.12	4/10	1.5	299.4 \pm 33.8
6.24	9/10	3.6	53.6 \pm 32.5
12.48	9/9	4.0	12.2 \pm 1.3

Occurrence of diarrhoea was observed for 6 h after rhein anthrone administration.

* Incidence of diarrhoea:

the number of diarrhoeal animals/total number of test animals

第2節 Rhein anthrone の瀉下作用に及ぼすPGE₂拮抗薬及びindomethacinの効果

緒言で述べたようにヒマシ油やジフェノール性下剤、ならびにセンナ製剤による瀉下作用発現に PG の放出が関与している可能性が示唆されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。Rhein anthrone の瀉下作用発現に PG が関与するならば PG の拮抗薬あるいは、生合成阻害薬で前処置すると瀉下作用発現が抑制されるはずである。そこで、rhein anthrone 又は PGE₂ の盲腸内投与の前にさまざまな経路で PGE₂ 拮抗薬である SC-19220²²⁾²³⁾ 又は poliphloretin phosphate (PPP)²³⁾²⁴⁾、あるいは PG 生合成阻害薬 indomethacin を投与し、rhein anthrone 又は PGE₂ の瀉下効果にどのような影響を及ぼすか観察した。

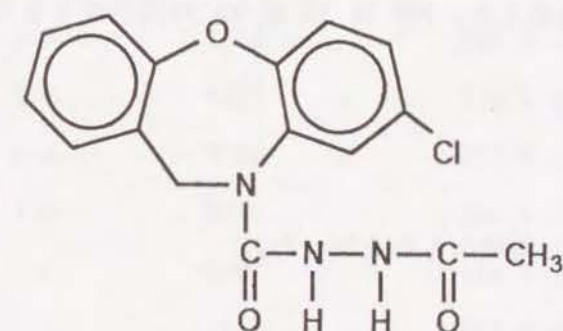


Fig.3 SC-19220

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) SC-19220 (アメリカ、Searle社より供与)

(2) poliphloretin phosphate (スウェーデン、LEO 社より供与)

(3) indomethacin (和光純薬)

その他の試薬は第1節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

Rhein anthrone 及び PGE_2 の試料は第1節と同様に調製した。SC-19220 及び indomethacin は Tween 80 (Sigma) 1滴で懸濁し、10 ml/kg の投与量となるように精製水で希釈した。PPP は 10 ml/kg の投与量となるように精製水に溶解した。

II. 実験動物

マウスは 第1節と同様のものを用いた。

III. 瀉下試験

第1節と同様に行った。

VI. 統計的評価

Cut off time を 6 時間として得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で表わし、有意差は Mann-Whitney の U-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

Table 2 Effect of SC-19220, PPP and indomethacin on rhein anthrone or PGE_2 induced diarrhoea

a) Rhein anthrone

Pretreatment	Route	Incidence of diarrhoea	Time to onset of diarrhoea(min)	
			mean	\pm s.e.m.
None		9/10	58.2	\pm 33.8
SC-19220	p.o.	0/10	360*	
	i.p.	1/10	325.1	\pm 34.9*
	i.c.	5/10	193.9	\pm 55.4
PPP	p.o.	8/10	130.6	\pm 42.8
	i.p.	6/10	166.6	\pm 52.7
	i.c.	6/9	133.9	\pm 56.7
Indomethacin	p.o.	1/10	337.4	\pm 22.6*
	i.p.	0/10	360*	
	i.c.	4/10	191.8	\pm 56.1

b) PGE₂

Pretreatment	Route	Incidence of diarrhoea	Time to onset of diarrhoea (min) mean \pm s.e.m.
None		9/10	54.9 \pm 34.2
SC-19220	p.o.	0/10	360*
	i.p.	1/10	328.0 \pm 32.0*
	i.c.	8/10	86.6 \pm 45.9
PPP	p.o.	9/10	50.8 \pm 34.4
	i.p.	8/10	91.2 \pm 45.1
	i.c.	10/10	18.1 \pm 5.6
Indomethacin	p.o.	8/10	107.5 \pm 43.8
	i.p.	7/10	123.2 \pm 51.1
	i.c.	10/10	26.5 \pm 6.5

Diarrhoea was observed for 6 h after rhein anthrone administration.

SC-19220 (100 mg/kg) was administered 30 min(p.o.), 15 min(i.p.) or 10 min(intracaecal, i.c.) before rhein anthrone or PGE₂.

PPP (100 mg/kg) was administered 60 min(p.o.), 30 min(i.p.) or 10 min(i.c.) before rhein anthrone or PGE₂.

Indomethacin (3 mg/kg) was administered 90 min(p.o.), 15 min(i.p.) or 10 min(i.c.) before rhein anthrone or PGE₂.

* P < 0.01 compared with treatment with rhein anthrone or PGE₂ alone.

Table 2 に示すように、経口又は腹腔内投与で前処置すると SC-19220 は、rhein anthrone による下痢を強力に抑制し、6 時間以内にはほとんど瀉下作用の発現を認めなかった。しかし、盲腸内投与によって SC-19220 を作用させた場合には、半数のマウスでは対照群と同じ rhein anthrone の瀉下効果が発現し、他の投与方法に比べて弱い抑制効果しか示さなかった。このように、拮抗薬が粘膜側から作用しても、rhein anthrone の瀉下作用が抑制されないということから、rhein anthrone の作用は大腸管腔内の粘膜表面で発現し、それを SC-19220 が抑制するのではないと考えられる。

同様に、盲腸内投与した PGE₂ により誘発される下痢に対しても、経口及び腹腔内投与した SC-19220 は強い抑制効果を示したが、盲腸内投与ではほとんど抑制効果を示さず、粘膜表面で PGE₂ に対する拮抗作用を発現するのではないことが推定される。

PPP は経口又は腹腔内投与で前処置すると rhein anthrone の瀉下作用発現所要時間を延長し、瀉下率をわずかに低下させたが、PGE₂ に対してはほとんど影響を与えず、SC-19220 と比べて弱い抑制作用しか示さなかった。また、盲腸内投与では SC-19220 と同様 に rhein anthrone、PGE₂ いずれに対しても抑制効果を示さなかった。

Indomethacin は経口又は腹腔内投与で前処置すると rhein anthrone による下痢を強力に抑制し、ほぼ全動物で抑制効果は 6 時間以上持続した。しかし、盲腸内投与では他の 2 経路と比べて弱い抑制効果しか示さなかった。また、盲腸内投与した PGE₂ により誘発される下痢に対して、indomethacin は経口又は腹腔内投与で前処置した場合に下痢の発現を遅延させたが、盲腸内投与では、ほとんど抑制効果を示さなかった。したがって、rhein anthrone が管腔内の粘膜表面で PG を生成し、瀉下作用を誘発する可能性は低いと考えられる。

以上、PGE₂ 拮抗薬の rhein anthrone の瀉下作用に対する抑制効果に強弱は

あるが、いずれも経口又は腹腔内投与で rhein anthrone の瀉下作用を抑制すること及び、PG 生合成阻害薬 indomethacin の前処置により rhein anthrone の瀉下作用が抑制されることから、PG が rhein anthrone の瀉下作用発現になんらかの関与をしていることは明白である。

第3節 大腸組織内PGE様物質生成に及ぼすrhein anthroneの効果

前節の結果より、rhein anthrone の瀉下作用発現に PGE 類の介在が示唆された。そこで、rhein anthrone を盲腸内に投与し、下痢発現時に大腸組織内で PGE 類の生成が促進するかどうか調べた。大腸組織内 PGE 類生成量はラット胃底標本を用いた生物学的検定法¹⁶⁾²⁵⁾²⁶⁾で胃底の収縮に基づいて定量した。その際、胃底収縮を誘発する PG 類以外の要因を除去する目的で副交感神経遮断薬の atropine、 α -adrenaline 受容体遮断薬の phenoxybenzamine、 β -adrenaline 受容体遮断薬の propranolol、抗 serotonin 薬の methysergide、抗 histamine 薬の pyrilamine、さらに内因性の PG による収縮を防止する目的で indomethacin を測定系に添加した。この条件で標品の PG 類の胃底収縮作用について調べると、PGE 類のみが収縮作用を示し、PGD₂、PGF_{2 α} 、6-keto PGF_{1 α} は収縮作用を示さなかった。しかし、本法では PGE₁、PGE₂、PGE₃ を個別に定量することは不可能であるので、PGE₂ による収縮を指標に、PGE 様物質として定量した。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) methysergide hydrogen maleate (スイス、Sandoz 社より供与)

(2) atropine sulphate (和光純薬)

(3) phenoxybenzamine hydrochloride (ナカライテスク)

(4) (±)propranolol hydrochloride (ナカライテスク)

(5) pyrilamine maleate (Sigma)

(6) prostaglandin E₁ (フナコシ)

(7) prostaglandin E₃ (フナコシ)

(8) prostaglandin D₂ (フナコシ)

(9) prostaglandin F_{2 α} (フナコシ)

(10) 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (フナコシ)

その他の試薬は第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

Rhein anthrone、PG 類及び indomethacin の試料は第1節、第2節と同様に調製した。その他のものは精製水に溶解した。

II. 実験動物

マウスは第1節と同様のものを用い、第1節と同様の盲腸内導管挿入手術を

施した。ラットはマウスと同様に飼育した Jcl:SD 雄性、体重 180 ~ 300 g (日本クレア) を用いた。

Ⅲ. 大腸組織内PGE様物質生成量の生物学的定量

1. 抽出

Rhein anthrone をマウスの盲腸内に投与し、下痢発現直後に ether によって死亡させた。対照群には vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液) を同様に投与し、rhein anthrone による下痢発現の平均時間に上記の方法で死亡させた。直後に大腸を摘出して盲腸と結腸以下にわけ、0.01 % indomethacin 含有の生理食塩水中で内容物を洗い出し、ただちに 70 % ethanol 10 ml の入った重量既知の秤量瓶に浸して酵素を失活させた後秤量し、その秤量差から組織重量を求めた。70 % ethanol は傾瀉した後、窒素ガスを通気して取り除いた。

PGE 様物質の抽出は Capasso の方法¹⁶⁾ に従った。それぞれの組織は ethyl acetate 10 ml と Sørensen の 0.1 M citrate · HCl 緩衝液で pH 3.0 に調整した Krebs-Henseleit 液* (1:1) 5 ml の混液中でホモジナイズし、遠心分離 (11000 g、5 ℃、5 分) した。水層を ethyl acetate 5 ml でさらに抽出し、先ほどの ethyl acetate 層と合わせて窒素気流下で減圧濃縮し PGE 様物質を含む残留物を得た。

Krebs-Henseleit 液調製法

0.90 % NaCl 溶液	100 ml
1.15 % KCl 溶液	4 ml
1.22 % CaCl ₂ 溶液	3 ml
2.11 % KH ₂ PO ₄ 溶液	1 ml
3.82 % MgSO ₄ 溶液	1 ml

1.30 % NaHCO₃ 溶液 21 ml を混合し、
無水 glucose を 1 l につき 1 g の割合で加えた。

2. 生物学的定量法^{16) 25) 26)}

前記のようにして得た PGE 様物質含有の残留物を Krebs-Henseleit 液に溶解して試料溶液とし、PGE 様物質の定量を行った。ラット胃底の切片を 5 % 二酸化炭素含有酸素の通気下、37 ℃ に加温した Krebs-Henseleit 液中につらし、アイソニックトランスデューサーを接続して試料液による胃底の収縮を記録した (装置: 多用途監視システム、日本光電製)。このとき、次のような阻害剤を添加し、PGE 様物質以外による胃底の収縮を防止した。

atropine sulphate	0.1 μg/ml
phenoxybenzamine hydrochloride	0.5 μg/ml
(±)propranolol hydrochloride	0.2 μg/ml
methysergide hydrogen chloride	0.1 μg/ml
pyrilamine maleate	0.1 μg/ml
indomethacin	0.2 μg/ml

(添加量は遊離塩基の重量で表示)

標品として PGE₂ を用い、収縮高に基づく検量線より、生成量を算出し、組織 g あたりの PGE₂ 相当量で表わした。

Ⅵ. 統計的評価

得られた結果は平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差は Student の t-検定を用いて検定した。

Table 3 Prostaglandin E-like material recovered from mouse large intestine by the administration of rhein anthrone alone or after pretreatment with indomethacin

	PGE-like material (ng PGE ₂ equivalent / g tissue) mean \pm s.e.m.			
	Caecum		Colon	
	Vehicle	RA	Vehicle	RA
Without indomethacin	61.0 \pm 7.7	65.7 \pm 9.6	21.2 \pm 1.8	49.7 \pm 5.5*
With indomethacin	21.2 \pm 1.6**	30.1 \pm 4.8*	13.1 \pm 1.1*	15.3 \pm 1.4**

Vehicle: 2 % NaHCO₃, RA: rhein anthrone

Each value is the mean \pm s.e.m. of 10 experiments.

* p < 0.001 compared with the vehicle group.

+ p < 0.01 and ** p < 0.001 compared with the respective group without indomethacin.

Table 3 に示すように結腸では PGE 様物質の生成量は約 2 倍に増加し、vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液) 投与群に対し有意な生成促進が認められたが、盲腸では生成促進は認められなかった。また、indomethacin 3 mg/kg を rhein anthrone 投与の 90 分前に経口投与で前処置すると、結腸における生成促進は有意に抑制され、薬物無処置群よりも低い値を示した。一方、indomethacin は vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液) 投与群においても大腸各部位の PGE 様物質生成を抑制し、rhein anthrone による PGE 様物質生成促進を抑制するだけでなく、生理的な PGE 様物質の生成も抑制することがわかった。Indomethacin の生理的な PG 生成抑制効果を差し引いても、rhein anthrone の PGE 様物質生成促進作用は indomethacin 前処置により 92 % 抑制されていると考えられる。なお、rhein anthrone の作用に対する indomethacin の抑制効果は次式により算出した。

$$\frac{\text{RA投与群に対するIndの効果} - \text{Vehicle投与群に対するIndの効果}}{\text{RAの効果}} \times 100 (\%)$$

RA: rhein anthrone, Ind: indomethacin

これらの事実は、indomethacin によって rhein anthrone の瀉下作用が抑制されることと考え合わせると、PGE 様物質の生成促進を介して rhein anthrone の瀉下作用が発現することを示唆するものである。また、rhein anthrone の作用部位は盲腸でなく主として結腸であると考えられる。

第4節 大腸組織内で生成促進するPGの同定

Rhein anthrone の盲腸内投与により マウス結腸組織内で生成が促進される PGE 類は、生物学的定量法では個別に定量することが不可能なため PGE₂ を標準品として定量したが、その種類はまだ同定されていない。PG の同定には GC/SIM が最も適しているという報告²⁷⁾があるので、この結腸組織内で生成促進した PGE 様物質について GC/SIM による検索²⁸⁾を行った。

〔実験方法〕

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

第1節 ～ 第3節と同様のものを用いた。

3. 試薬などの調製

第1節 ～ 第3節と同様に調製した。

II. 実験動物

マウスは 第1節と同様のものを用い、第1節と同様の盲腸内導管挿入手術を施した。

III. PGE 様物質のガスクロマトグラフィー質量分析法による確認

1. PGE 様物質の抽出

Rhein anthrone をマウス盲腸内に投与し、下痢発現直後に ether によって死亡させた。対照群には vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液)を盲腸内投与し、rhein anthroneによる下痢発現の平均時間に上記の方法で死亡させた。直後に結腸を摘出し、0.001 % indomethacin含有の生理食塩水中で内容物を洗い出し、ただちに 70 % ethanol 10 ml の入った重量既知の秤量瓶に浸して酵素を失活させた後、秤量し、その秤量差から組織重量を算出した。結腸組織を70 % ethanol 中でホモジナイズして遠心分離(11000 g、5 ℃ 5 分)後、Kiyomiya らの方法²⁹⁾に従って PGE 様物質を抽出した。遠心分離後の上澄液を 精製水で希釈して ethanol 濃度を 15 % とし、1 N HCl で pH を 3.0 に調整した。この溶液をあらかじめ methanol 及び H₂O で洗浄した Bond-Elut C₁₈ に吸着させ、H₂O 20 ml、15 % ethanol 20 ml、benzen 20 ml を順次流した後 ethyl acetate-methanol (9:1)で PGE 様物質を溶出させた。最後の ethyl acetate-methanol 溶出液は窒素気流下減圧濃縮乾固させた。

2. ガスクロマトグラフィーのための PGE 様物質の誘導化³⁰⁾

ガスクロマトグラフィーを行うために PGE 様物質の誘導化を行った。減圧濃縮乾固させた PGE 様物質に、100 μl の 5 mg/ml O-methylhydroxylamine hydrochloride-pyridine 溶液を加え 38 ℃ で1時間反応させた。溶媒は窒素気流下、38 ℃ の水浴上で加温、除去し、残留物は窒素気流下乾燥させた。次に、30 μl の acetonitrile、10 μl の 35 % pentafluorobenzylbromide-acetonitrile 溶液、10 μl の N,N-di-isopropylethylamine を加え、40 ℃ で15分間反応させた。過剰の試薬は窒素気流下 40 ℃ 減圧で除去した。残留物に 2mlの飽和食塩水を加えて benzene 2 ml で抽出した後、benzene 1 mlで抽

出した。Benzene 抽出液を合わせて 1 g の sodium sulphate, anhydrous で脱水し、0.5 ml まで濃縮した。Ethyl acetate 及び benzene で洗浄後 hexane 中で保存した silicagel を充填したカラム (0.6 X 5 cm) にこの benzene 抽出液を吸着させた。10 ml の ethyl acetate-benzene (1:9) 溶液を流した後、30 ml の methanol-ethyl acetate (1:99) 溶液で PGE 様物質誘導体を溶出し、窒素気流下減圧濃縮乾固した。残留物に 100 μ l の N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide を加え、一夜室温で反応させた後窒素気流下 60 $^{\circ}$ C で減圧濃縮乾固した。

3. 確認

この残留物を hexane に溶解して試料とし、ガスクロマトグラフィー (装置: 島津 GC-9A、カラム: fused silica capillary column (0.33 mm X 25 m, film 層: 0.5 μ m、島津キャピラリーカラム CBP1-S25-050)、注入量: 5 μ l、スプリット比: 15:1、カラム温度: 250 $^{\circ}$ C、インジェクター温度: 280 $^{\circ}$ C、メイクアップガス及びキャリアーガス: 窒素 流速 50 ml/min、検出器: ECD) 及びポジティブイオンマススペクトロメトリー²⁸⁾ (装置: JEOL JMS-DX 303 ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター、JEOL JMS-DA 5000 データシステム、日本分光製。試料は solventless-injector で注入、キャリアーガス: ヘリウム 流速 50 ml/min、イオン源温度: 220 $^{\circ}$ C、その他の条件は前記と同様)を行った。

VI. 統計的評価

ピーク高さについて得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で表わし、有意差は Student の t-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

まず、rhein anthrone 盲腸内投与による下痢発現直後の結腸組織より抽出した PGE 様物質について ECD を用いたガスクロマトグラフィーで検討したところ、rhein anthrone 投与によって retention time (tR) 30.8 分及び 35.1 分付近の 2 つのピークが vehicle 投与群と比べ有意に増大した。これらの 2 つのピークの tR を標品の各種 PG の tR と比較すると PGE₂ 又は PGE₃ に相当した。また、それぞれの 2 つのピークは、誘導化の段階で生じた syn- 及び anti- 形に基づく³¹⁾と考えられた。PGE₁ に相当する tR のピークは vehicle 投与群と rhein anthrone 投与群の間に有意な差は認められなかった (Table 4、Table 5)。

Table 4 Comparison of retention times of PGs

PG	Retention time(min)	
PGE ₁	33.66	38.27
PGE ₂	30.81	35.08
PGE ₃	30.89	35.11
PGD ₂	30.56	33.45

Table 5 Height of the chromatography peak corresponding to PGE₁, PGE₂ and PGE₃

Retention time (min)	Peak height(mV)			
	PGE ₁	PGE ₂ and PGE ₃		
	33.66	38.27	30.81~30.89	35.08~35.11
Vehicle (2% NaHCO ₃)	0.46 ± 0.13	0.53 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.78 ± 0.21
Rhein anthrone	0.60 ± 0.08	0.53 ± 0.06	1.68 ± 0.23*	2.08 ± 0.05*

Each value is the mean ± s.e. of 5 experiments.

* p < 0.05 and ** p < 0.01 compared with the respective vehicle groups.

Table 6 The peak hight ratio of each ion peak

Retention time	PGE ₂		Mouse colonic extract	
	27.9	32.0	27.9	32.0
705	0.03	0.09	0.07	0.09
674	0.20	1.00	0.50	1.00
615	0.13	0.70	0.25	0.73
584	0.31	0.85	0.84	0.88

次に、これらのピークについて詳細に検討するため GC/SIM の測定を行った。標品の PGE₂、PGE₃ 誘導体の GC/MS の測定を行ったところ、PGE₂ の場合 m/z 705 に分子イオンピークが、m/z 674、615、584 にフラグメントピークが、PGE₃ の場合 m/z 703 に分子イオンピークが、m/z 688、672、634、544 にフラグメントイオンピークが得られた。その結果をもとに、標品および rhein anthrone 投与後のマウス結腸組織から得られた PGE 様物質の誘導体を m/z 705、674、615、584 (PGE₂)、m/z 688、672、634、544 (PGE₃) についてモニターした。結果は Fig. 4 に示すとおりで、マウス結腸組織抽出物では PGE₂ を対象とした m/z 705、674、615、584 についてモニターした場合に、標品と一致する tR 27.9、32.0 分にピークが認められた。しかし、PGE₃ を対象としてモニターした m/z 688、672、634、544 では標品の tR 32分付近のピークがマウス結腸組織抽出物では認められなかった。したがって、rhein anthrone 投与によって結腸組織で生成が促進している PG は PGE₂ だけと考えられ、PGE₃ である可能性は低いと考えられる。

さらに、これら2つのピークの高さの比と標品の PGE₂ によるピーク高さの比を比較すると、Table 6 に示すように tR 32.0 分のピークでは両者の比がほぼ一致した。tR 27.9 分のピークは標品よりも高い比率を示した。これは GC-SIM で PGE₂ についてモニターした際に tR 30分にみられるピークとともに、PGD₂ あるいは不純物の混在に基づくものと考えられる。しかし、ECD を用いたガスクロマトグラフィーの結果、rhein anthrone 投与により、PGD₂ に相当するピークが増大していないことから PGD₂ の生成は増加していないといえる。

以上の結果から、rhein anthrone によりマウス結腸内で生成促進された PGE 様物質が PGE₁、PGE₃ ではなく PGE₂ であることが確定した。

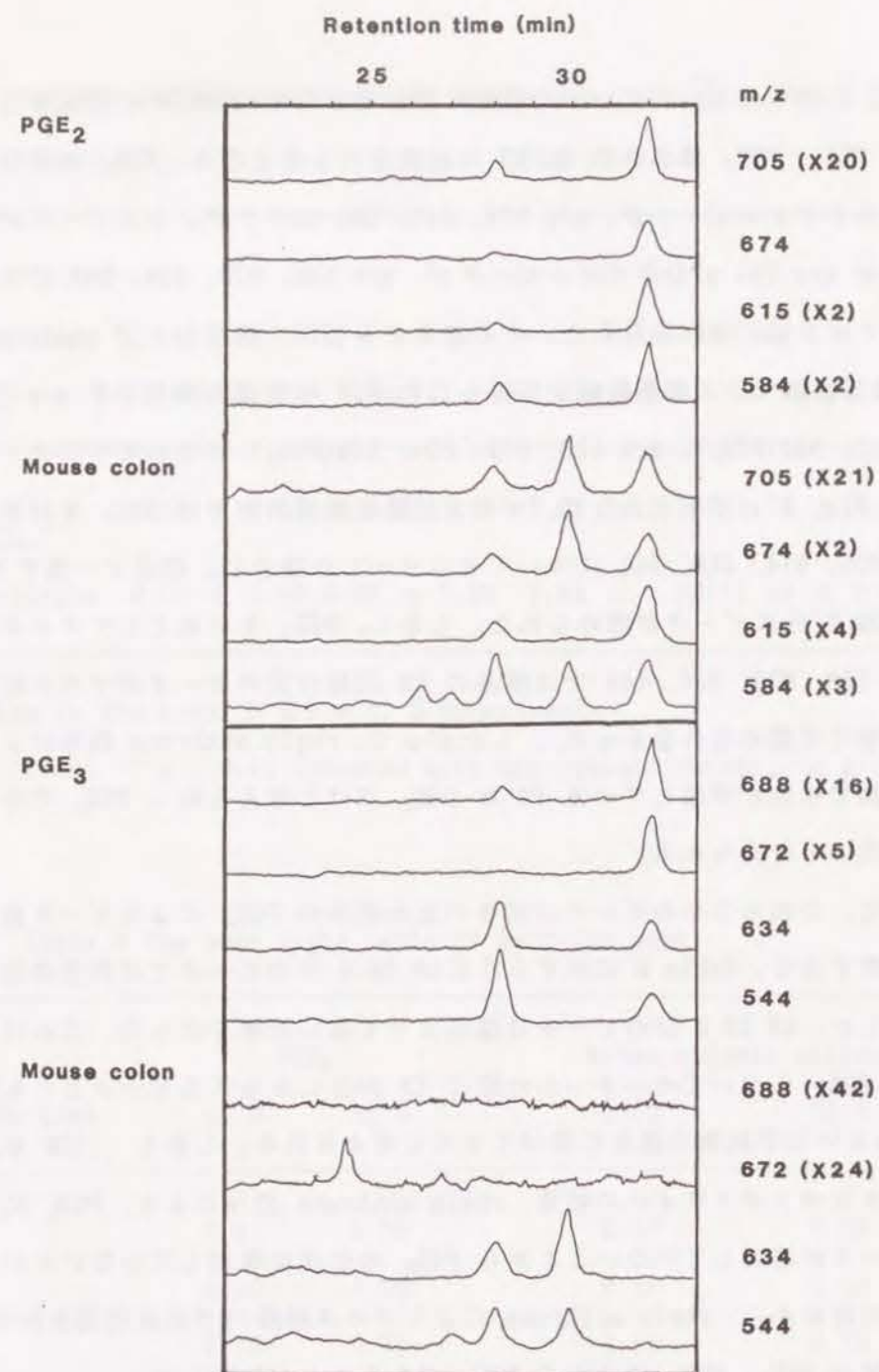


Fig. 4 Selective ion monitoring chromatogram of authentic PGE₂ and PGE₃, and mouse colonic extracts PFB ester methoxime TMS derivatives

第5節 大腸内輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果

第1節から第4節において、rhein anthrone が PGE₂ の生成促進を介して瀉下作用を発現することを明らかにした。瀉下作用発現には腸の運動性と腸管内腔液量の変化が関与すると考えられているが、マウスにおいて rhein anthrone が PGE₂ の介在によって腸の運動性、腸管内腔液量いずれに影響を及ぼして瀉下作用を発現するのか検討した。腸の運動性を検討する1つの手段として、作用部位の大腸の輸送速度を調べた。Rhein anthrone を盲腸内に投与した直後にマーカーの BaSO₄ 水懸濁液を盲腸内に注入し、マーカーを含む白色便が最初に排泄されるまでの所要時間を測定し、輸送速度の指標とした。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

第1節、第2節と同様のものを用い、第1節、第2節と同様に調製した。

II. 実験動物

マウスは第1節と同様のものを用い、第1節と同様の盲腸内導管挿入手術を施した。

III. 大腸内輸送時間の測定¹⁾

Rhein anthrone 又は vehicle である 2 % NaHCO₃ 溶液を盲腸内に投与した直後にマーカーとして 20 % BaSO₄ 水懸濁液 0.1 ml/匹を導管より盲腸内に注入し、BaSO₄ の混じった白色便が排泄されるまでの時間を測定した。白色便排泄率は投与後6時間以内の白色便排泄動物数/全実験動物数で表わした。

VI. 統計的評価

Cut off time を6時間として得られた結果は平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差は Mann-Whitney の U-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

Rhein anthrone を盲腸内投与した直後にマーカーの BaSO₄ を盲腸内に注入し、最初に白色便が排泄されるまでの時間を観察し、排泄が促進されるかどうか調べた。その結果、白色便は下痢を伴って排泄され、その排泄までの時間は Table 7 に示すように vehicle 投与群の102分が rhein anthrone 投与によって20分に有意に短縮され、rhein anthrone に大腸内輸送促進作用が認められた。SC-19220 又は indomethacin を経口投与で前処置すると、rhein anthroneの大腸内輸送促進作用は有意に抑制され、6時間以内には約半数しか白色便を排泄しないほどの抑制を受けた。SC-19220 及び indomethacin は vehicle 投与群の大腸内輸送も有意に抑制し、正常輸送を強く抑制すると推定された。Rhein anthrone投与群に対して示した抑制効果もこの正常輸送の抑制に基づく部分が大きいかも知れない。PPP は vehicle 投与群、rhein anthrone 投与群いずれに対しても有意な影響を及ぼさなかった。対照実験として盲腸内投与したPGE₂ も rhein anthrone 同様の腸内輸送促進作用を示したが、この促進作用は indomethacin によって抑制されなかった。

以上の結果より、rhein anthrone の瀉下作用発現には大腸内輸送促進作用が関与することが明らかになった。瀉下作用の場合と同様に、2つの PGE₂ 拮抗薬の抑制効果には差があるが、indomethacin による抑制効果と総合すると、rhein anthrone の大腸内輸送促進作用には少なくとも部分的に PGE₂ が介在すると考えられる。

Table 7 Effect of SC-19220, PPP and indomethacin on normal and rhein anthrone-induced stimulatory large intestinal transit

First	Administration		Incidence of marker excretion	Transit time(min) mean ± s.e.m.
	First	Second		
Vehicle	Vehicle	Vehicle	9/10	102.0 ± 31.0
vehicle	Rhein anthrone	Rhein anthrone	9/9	20.8 ± 2.1*
SC-19220	Vehicle	Vehicle	3/10	345.9 ± 7.6*
SC-19220	Rhein anthrone	Rhein anthrone	4/10	322.4 ± 29.9 ⁺
PPP	Vehicle	Vehicle	10/10	67.8 ± 20.2
PPP	Rhein anthrone	Rhein anthrone	10/10	36.1 ± 9.4
Indomethacin	Vehicle	Vehicle	9/10	167.3 ± 22.0*
Indomethacin	Rhein anthrone	Rhein anthrone	5/10	234.8 ± 42.0 ⁺

Marker excretion was observed for 6 h after rhein anthrone administration.

Incidence of marker excretion :

the number of animals which had excreted marker within 6 h /
the total number of test animals

SC-19220 (100 mg/kg), PPP (100 mg/kg) or indomethacin (3 mg/kg) was given orally 30 min, 60 min or 90 min respectively before rhein anthrone or vehicle (2 % NaHCO₃ solution) administration.

* p < 0.01 compared with the vehicle-vehicle group.

⁺ < 0.01 compared with the vehicle-rhein anthrone group.

第6節 結腸内腔液量及び結腸内 Na^+ 、 K^+ 膜輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果

瀉下作用発現のもう1つの因子として大腸内腔液量の変化が考えられる。この点について、rhein anthroneの作用部位と考えられる結腸においてrhein anthroneの腸管内腔液量の変化に及ぼす効果を調べた。また、Beubler³²⁾が水及び電解質分泌作用と密接に関連していると指摘している管腔内へのPG放出量を定量し、水及び電解質分泌作用とPGの関係を検討した。

Urethane麻酔下、結腸内にrhein anthroneを含むTyrode液を注入して両端を結紮して1時間後に内腔液を抜き取り³³⁾、内腔液中の PGE_2 放出量を酵素免疫測定法³⁴⁾で、残りの内腔液を遠心分離後その上澄液について貯留水量を重量法で¹⁴⁾、 Na^+ 、 K^+ 濃度を原子吸光光度法で測定した。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) urethane (片山化学)

その他のものは第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

Urethaneは10 mg/kgの投与量になるように精製水に溶解した。その他の

ものは第1節、第2節と同様に調製した。

II. 実験動物

マウスは第1節と同様のものを用いた。

III. 結腸内腔液の測定

1. 結腸結紮法¹⁴⁾³²⁾

マウスをurethane (2.25 g/kg、腹腔内注射)で麻酔し、腹部を正中線に沿って切開し、盲腸と結腸の結合部をゆるく結紮し、注射針を用いて37℃の温生理食塩水(0.15 M NaCl溶液、5 ml)で結腸内を注意深く洗浄した。30分後、下端を結紮してrhein anthrone (6.24 mg/2.5 ml/kg)を含むTyrode液* (0.5 ml)を結腸内に注入し、上端を結紮した。対照群にはvehicle (2 % NaHCO_3 溶液、2.5 ml/kg)を含むTyrode液(0.5 ml)を注入した。60分後、皮下用注射針を用いて少量(約0.2 ml)の内腔液を PGE_2 の定量を行うために注意深く抜き取った後、chloroformによって死亡させた。

* Tyrode液調製法

NaCl	8.0 g	
KCl	0.2 g	
CaCl_2	0.2 g	
MgCl_2	0.1 g	を1 lの精製水に溶解後
NaH_2PO_4	0.05 g	
NaHCO_3	1.0 g	
無水 glucose	1.0 g	を加えて溶解した。

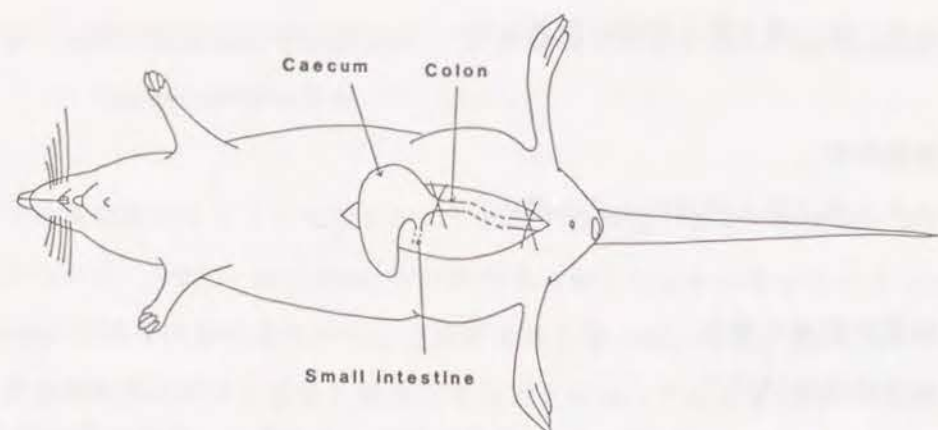


Fig. 5 Ligated colon

2. PGE₂ の酵素免疫法による定量

(1) 抽出²⁹⁾

結紮した結腸より抜き取った内腔液に H₂O を加えて 2.0 ml とし、1 N の HCl を用いて pH 3.0 に調整後、PGE₂ を ethyl acetate 5 ml で 2 回抽出した。Ethyl acetate 抽出液を合わせて減圧濃縮し、残留物は 15 % ethanol に溶解後 0.1 N HCl で pH 3.0 に調整し、Bond-Elut カートリッジに吸着させた。H₂O 20 ml、15 % ethanol 20 ml、benzene 20 ml、ethyl acetate-methanol (9:1) 5 ml で順次溶出させた。最後の ethyl acetate-methanol 溶出液を減圧濃縮し、緩衝液 (A) に溶解して試料液とした。

緩衝液 (A)	緩衝液 (B)
0.1 M NaCl	0.1 M NaCl
1 mM MgCl ₂	1 mM MgCl ₂
0.1 % NaN ₃	0.1 % NaN ₃ を含む
0.1 % ovalbumin を含む	10 mM sodium phosphate 緩衝液 pH 7.0
10 mM sodium phosphate 緩衝液 pH 7.0	

(2) 定量³⁴⁾

緩衝液 (B) に溶解した PGE₂ 抗体 (4.6 μg/ml、150 μl) をポリスチレン製蛍光免疫測定用プレートに注入し、37 °C で 1 時間吸着させた。反応液を捨て、緩衝液 (A) でプレートを十分に洗浄した後、緩衝液 (A) を 250 μl 注入し 37 °C で 30 分間放置した。反応液を捨て、緩衝液 (A) でプレートを洗浄後 PGE₂ 標品又は試料液 100 μl を注入し、ただちに緩衝液 (A) に溶解した PGE₂-β-galactosidase 標識抗原 (13.95 fmol PGE₂ mimic (9-deoxy-9-methylene-PG F_{2d}), 0.1 ng β-galactosidase) 100 μl を注入し、4 °C で一夜放置した。

プレートの温度を室温に戻した後、反応液を捨て緩衝液 (A) で洗浄した。β-galactosidase と反応させるために、0.0035 % 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside 150 μl を注入し 30 °C で 1 時間放置後、1 M glycine-NaOH 緩衝液 100 μl を加えて酵素反応を停止させた。

酵素反応で生成した methylumbelliferon による蛍光は、蛍光標準物質として quinine sulphate を用い、励起光波長 360 nm、射出光波長 450 nm で測定した (装置: マイクロプレートリーダー MTP-32、付属蛍光装置 MTP-F2、コロナ電気製)。同時に操作した標品の PGE₂ から得た検量線より PGE₂ 放出量を算出し、ng/g 組織で表わした。

3. 水、Na⁺、K⁺ 輸送の測定

マウスを chloroform で死亡させた後、ただちに結腸を摘出し、重量 (A) を測定した。皮下注射針を用いて内腔液を抜き取って重量既知の遠沈管に移し、内腔液を抜き取った後の空の結腸組織重量 (B) を測定した。内腔液を遠心分離 (14000 g、5 °C、20 分) し、上澄液を試験管に移し、沈殿した粘液様分画の重量 (C) を測定した。

水の移動量は Beubler らの方法に従い¹⁴⁾ 次のように算出し、ml/g 組織で

表わした。なお、PGE₂の定量に用いた内腔液中の水量も加算した。

$$(A) - (B) - (C) - 0.5 / (B)$$

Na⁺、K⁺量は原子吸光光度法（装置：180-60 偏光ゼーマン原子吸光光度計 日立製作所）により測定し、標準液から作成した検量線より算出した。前記の上澄液中の Na⁺、K⁺量と注入した Tyrode 液中に含まれる Na⁺、K⁺量との差を電解質移動量とし、μmol/g 組織で表わした。

いずれも正の値は分泌を、負の値は吸収を表わす。

[結果及び考察]

Table 8 Effect of rhein anthrone on PGE₂ release into mouse ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	PGE ₂ released (ng/g tissue)	
	Vehicle (NaHCO ₃)	Rhein anthrone
Without indomethacin (n=7)	12.88 ± 1.21	22.49 ± 2.32*
With indomethacin (n=7)	8.02 ± 0.60*	10.95 ± 1.60*

* p < 0.01 compared with the vehicle group.

+ p < 0.01 compared with the respective groups without indomethacin.

Table 9 Effect of rhein anthrone on net water flux and electrolyte transport in mouse ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	Net water flux (ml/g tissue)	Na ⁺ transport (μmol/g tissue)	K ⁺ transport (μmol/g tissue)
Without indomethacin			
Vehicle	-0.18 ± 0.05	-61.81 ± 10.88	+9.17 ± 1.28
Rhein anthrone	-0.04 ± 0.05*	-36.16 ± 10.08	+14.28 ± 1.28**
With indomethacin			
Vehicle	-0.44 ± 0.05**	-103.77 ± 10.00*	+8.37 ± 0.99
Rhein anthrone	-0.24 ± 0.06**	-78.69 ± 10.69*	+11.62 ± 1.36

Vehicle : 2 % NaHCO₃

Each value is the mean ± s.e.m. of 30 experiments.

A negative value denotes net absorption and a positive value net secretion.

* p < 0.05 and ** p < 0.01 compared with the respective vehicle groups.

+ p < 0.01 and ** p < 0.001 compared with the respective groups without indomethacin.

Table 8 に示すように rhein anthrone によって結腸管腔内への PGE_2 放出量は約 2 倍に増加した。試料投与の 90 分前に indomethacin 3 mg/kg を経口投与で前処置すると vehicle 投与群、rhein anthrone 投与群双方において PGE_2 放出は有意に抑制された。したがって、indomethacin は結腸管腔内への生理的な PGE_2 放出も抑制すると考えられるが、その作用を差し引いても rhein anthrone の結腸内 PGE_2 放出促進作用は、indomethacin によって 70 % 抑制されると判断できる。

水、 Na^+ の輸送は Table 9 に示すように、vehicle 投与群においては吸収状態にあり、正常な状態では結腸では内腔液の貯留は起こっていないと推定される。Rhein anthrone により内腔液量にどのような変化が起こるのか調べたところ、これらの吸収は抑制されたが、分泌促進は認められなかった。また、rhein anthrone は K^+ の分泌を促進した。

Rhein anthrone 又は vehicle 投与の 90 分前に indomethacin 3 mg/kg を経口投与で前処置すると、両群において水、 Na^+ 吸収が促進され、 K^+ 分泌の抑制傾向が見られた。Indomethacin は正常状態の結腸内における水及び Na^+ 吸収を強く促進し、rhein anthrone の水及び Na^+ 吸収抑制作用が indomethacin 前処置によって阻害されたのは、この生理的な水及び Na^+ 吸収促進に基づく部分が大きいと考えられる。Indomethacin の正常な水及び Na^+ 輸送に及ぼす作用を差し引くと、rhein anthrone の Na^+ 吸収抑制作用は indomethacin によりわずか 2.2 % 阻害されるだけであり、水吸収抑制作用は影響を受けないと判断される。同様に、rhein anthrone の K^+ 分泌促進作用は indomethacin によって 36 % 抑制されると考えられる。

以上の結果より、rhein anthrone はマウスにおいては水及び Na^+ 吸収を抑制するが分泌は促進せず、結腸内水貯留作用は弱いと推定される。Indomethacin の前処置によってこの結腸内水貯留作用はほとんど影響を受けず、むしろ

正常な水及び Na^+ 輸送が影響を強く受けることから、生理的な水及び Na^+ 輸送における PGE_2 の関与が大きいと推察される。

第 7 節 結腸内粘液分泌に及ぼす rhein anthrone 並びに indomethacin の効果

Rhein anthrone をマウス盲腸内に投与すると特徴的な粘液便を排泄する。前節では rhein anthrone は結腸内における水貯留作用の弱いことが明らかになり、結腸内腔液貯留は、むしろ、結腸内粘液分泌促進に基づくと考えられるので、第 6 節と同様に結紮した結腸より得た内腔液について、粘液量を総蛋白結合 hexose として³⁵⁾ 定量し、rhein anthrone の結腸内粘液分泌に対する作用を検討した。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第 1 節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) orcinol (Sigma)

その他のものは第 1 節、第 2 節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

Orcinol は精製水に溶解し、その他のものは第1節、第2節と同様に調製した。

II. 実験動物

マウスは第1節と同様のものを用いた。

III. 粘液分泌量の測定³⁵⁾

第6節と同様の方法で urethane 麻酔下、結腸内を温生理食塩水で洗浄後、下端を結紮し、rhein anthrone (6.24 mg/2.5 ml/kg) 又は PGE₂ (0.2 mg/2.5 ml/kg) を含む Tyrode 液を注入して上端を結紮した。60分後、chloroform によって死亡させ、ただちに結腸を摘出して内腔液を皮下注射針で抜き取り、結腸組織重量を測定した。得られた結腸内腔液を超音波処理 (45kHz, 60 W) した後、10 % trichloroacetic acid 溶液を加えて遠心分離した。沈澱した粘液様物質は 95 % ethanol で洗浄して遠心分離後、95 % ethanol を取り除いて 0.1 M NaOH 溶液 1 ml を加えて溶解した。8.5 ml の冷 orcinol 試液 (60 % H₂SO₄-1.6 % orcinol 溶液、7.5:1) を加えた。80 °C で正確に15分間加熱した後、ただちに冷水中で冷却して 540 nm における吸光度を測定した。標品として用いた galactose から得られた検量線より hexose 量を算出し、粘液分泌量を総蛋白結合 hexose (TPBH) として mg TPBH/g 組織で表わした。

[結果及び考察]

結果はTable 10 に示すとおりで、rhein anthrone は結腸内における総蛋白結合 hexose 量を vehicle投与群に比べ約2倍に増加させ、粘液分泌促進作用が認められた。Rhein anthrone 投与90分前に indomethacin 3 mg/kg を

経口投与で前処置すると、この粘液分泌促進作用は有意に抑制された。同様の indomethacin 前処置は vehicle 投与群の粘液分泌作用にはほとんど影響を及ぼさず、indomethacin によって rhein anthrone の粘液分泌促進作用は 49 % 抑制されると考えられる。対照実験として rhein anthrone のかわりに PGE₂ 0.2 mg/kg を結腸内に注入すると rhein anthrone と同程度の粘液分泌促進作用が認められた。

Table 10 Effect of rhein anthrone and PGE₂ on mucus secretion in mouse ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	Mucus secretion (mg TPBH/g tissue)		
	Vehicle	Rhein anthrone	PGE ₂
Without	0.53 ± 0.03	1.20 ± 0.07*	1.02 ± 0.07*
indomethacin	(n = 16)	(n = 16)	(n = 15)
With	0.50 ± 0.04	0.84 ± 0.05*†	
indomethacin	(n = 15)	(n = 16)	

Vehicle: 2 % NaHCO₃

Each value is the mean ± s.e.m.

* p < 0.001 compared with the respective vehicle groups.

† p < 0.001 compared with the rhein anthrone group without indomethacin.

これらの結果は rhein anthrone による結腸内粘液分泌促進に PGE_2 の介在することを示している。また、vehicle 投与群では indomethacin によって PGE_2 の生成並びに放出が抑制されても粘液分泌には影響がないことから、正常な結腸内粘液分泌には PGE_2 の関与は少ないと考えられる。

一方、結腸内腔液中の粘液分泌量増加は粘膜に対する rhein anthrone の直接的な作用により粘液が剥離して管腔内へ放出された可能性³⁸⁾も否定できず、rhein anthroneの粘液分泌促進作用が indomethacin の前処置によって完全には抑制されなかったのは、この直接作用が抑制されなかったのが原因とも考えられる。しかし、この分泌促進に少なくとも部分的に PGE_2 の関与することは確実である。

第8節 結腸内粘液生合成に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果

前節において rhein anthrone の結腸内粘液分泌促進作用が確認されたが、これが粘液の生合成促進によるものかどうかを調べた。 ^{14}C -galactose を静脈内投与し、rhein anthrone投与後、第6節と同様にして両端を結紮した結腸より得た内腔液における ^{14}C の粘液への取り込み量から粘液生合成量推定し³⁶⁾、rhein anthrone の粘液生合成に及ぼす効果を検討した。

〔実験方法〕

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) D-[U- ^{14}C]galactose (Amersham International)

その他は第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

^{14}C -Galactoseは $2\ \mu\text{Ci}/0.2\ \text{ml}$ になるように精製水に溶解し、その他のものは第1節、第2節と同様に調製した。

II. 実験動物

マウスは 第1節と同様のものを用いた。

III. 粘液生合成量の測定³³⁾

^{14}C - galactose 溶液 ($2\ \mu\text{Ci}/匹$) をマウス尾静脈に注射して3時間後、第6節と同様の方法で urethane 麻酔下、結腸内を温生理食塩水で洗浄後、下端を結紮し、rhein anthrone ($6.24\ \text{mg}/2.5\ \text{ml}/\text{kg}$) 又は PGE_2 ($0.2\ \text{mg}/2.5\ \text{ml}/\text{kg}$) を含む Tyrode 液を注入して上端を結紮した。60分後、マウスを chloroform によって死亡させ、ただちに結腸を摘出して内腔液を皮下注射針で抜き取り、結腸組織重量を測定した。得られた結腸内腔液を超音波処理 ($45\ \text{kHz}$, $60\ \text{W}$) した後、10 % trichloroacetic acid 溶液を加えて遠心分離した。

沈澱した粘液様物質は $1\ \text{M NaOH}$ 溶液に溶解し、 ^{14}C の放射活性を測定した (装置: TRI-CARB460CD Packard 製)。粘液生合成量は $\text{dpm TPBH}/\text{g}$ 組織で表わした。なお実験終了時に心臓採血し血漿中の ^{14}C の放射活性が $20000\ \text{dpm}/\text{ml}$ 以上あることを確認した。

[結果及び考察]

Table 11 Effect of rhein anthrone and PGE₂ on mucus synthesis in mouse ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	Mucus synthesis (dp _m TPBH/g tissue)		
	Vehicle	Rhein anthrone	PGE ₂
Without	1524.2 ± 106.5	2275.1 ± 124.8**	2468.2 ± 194.7**
indomethacin	(n = 16)	(n = 16)	(n = 10)
With	1215.9 ± 98.6*	1540.8 ± 98.5**	
indomethacin	(n = 16)	(n = 16)	

Vehicle : 2 % NaHCO₃

Each value is the mean ± s.e.m.

* p < 0.05 and ** p < 0.001 compared with the respective vehicle groups.

+ p < 0.05 and ++ p < 0.001 compared with the respective groups without indomethacin.

Rhein anthrone は結腸における総蛋白結合 hexose の生合成量を 1.5 倍に増加させ、有意な粘液生合成促進作用を示した。Rhein anthrone 投与90分前

に経口投与で indomethacin 3 mg/kg を前処置すると生合成促進作用は有意に抑制された。同様の indomethacin 前処置は vehicle 投与群の粘液生合成も有意に抑制し、生理的な粘液生合成も indomethacin によって抑制されることがわかった。この indomethacin による正常な粘液生合成抑制作用を差し引いても、indomethacin により rhein anthrone の粘液生合成促進作用は、57 % 抑制されると判断される。また、PGE₂ 0.2 mg/kg を rhein anthrone のかわりに結腸内に注入すると予期したとおり粘液生合成が有意に促進された (Table 11)。

これらの事実は rhein anthrone が PGE₂ の介在する結腸内粘液生合成促進を誘発し、その結果粘液分泌促進がおこる可能性を支持するものである。そして、粘液便排泄の原因となる結腸内腔液貯留もこの分泌促進した粘液の占める割合が大きいと考えられる。

第9節 小括

マウスにおける rhein anthrone による粘液便を伴う下痢は、PGE₂ の拮抗薬 SC-19220 及び PG 生合成阻害薬 indomethacin で強力に抑制されること、下痢発現時に結腸組織内の PGE₂ 生成が促進されていること、さらに盲腸内投与した PGE₂ による下痢が rhein anthrone によって誘発される下痢と類似することから、rhein anthrone の瀉下作用は結腸における PGE₂ の生成及び放出促進を介して発現することが確かめられた。

さらに、マウスにおける rhein anthrone の瀉下作用発現の機序としては、PGE₂ の介在する大腸内輸送促進作用ならびに結腸内粘液の生合成及び分泌促進作用が明らかにされた。

第2章 ラットにおけるrhein anthroneの瀉下作用とその作用機序

本章ではラットにおけるrhein anthroneの瀉下作用とその作用機序をマウス同様に検討し、マウスにおけるそれと比較した。

第1節 盲腸内投与したrhein anthroneの瀉下活性

ラットにおけるsennoside Aの腸管内活性代謝物質はrhein anthroneであることが明らかになっている³⁾ので、マウスと同様にrhein anthroneを盲腸内導管¹⁷⁾より盲腸内に直接投与し、瀉下作用を調べた。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1章第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) PGE₂

第1章第1節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

第1章第1節と同様にして調製した。なお、vehicle溶液を盲腸内に投与しても瀉下作用は全く認められなかった。

II. 実験動物

ラットはJcl:Wistar 雌性、体重100～120g(日本クレア)を用いた。ラットは固形飼料(MF、オリエンタル酵母)で飼育し、飼育及び実験は22～25℃の部屋で行った。実験前一夜絶食したが水は自由に与えた。

III. 瀉下試験

第1章第1節に準じて行った。盲腸内導管挿入手術の際はペントバルビタール(3.3～4.0mg/匹、腹腔内投与)で麻酔した。瀉下作用は投与後8時間観察した。Cut off timeを8時間として得られた結果は平均値±標準誤差で表わした。

[結果及び考察]

Rhein anthroneを盲腸内投与すると、用量依存的に作用は増強し、sennoside A/B 20mg/kgに相当する12.48mg/kgで約15分後に全動物に水様、粘液性の下痢を誘発した(Table 12)。Rhein anthroneによる下痢は一過性で、瀉下作用は1～2時間持続した。下痢便はマウスに比べ、スコアが低く粘液よりも水分の多い状態であった。マウスと同じ投与量である6.24mg/kgでも全動物に瀉下作用は発現するが、瀉下作用発現所要時間にばらつきが大きく、安定した瀉下活性の得られる12.48mg/kgを本実験の投与量として採用した。

対照実験としてPGE₂を盲腸内に投与したが、マウスの場合と異なり0.8mg/kgでさえ瀉下作用は全く認められなかった。

Table 12 Purgative activity of rhein anthrone administered
intracaecally

Dose (mg/kg)	Incidence of diarrhoea	Mean diarrhoea score	Time to onset of diarrhoea (min) mean \pm s.e.
1.56	0/10	0	480
3.12	6/10	1.8	233.1 \pm 52.6
6.24	10/10	3.0	34.3 \pm 12.7
12.48	10/10	3.4	15.8 \pm 1.5

Occurrence of diarrhoea was observed for 8 h after rhein anthrone administration.

Incidence of diarrhoea:

the number of diarrhoeal animals / the total number of test animals

第2節 Rhein anthroneの瀉下作用に及ぼすindomethacinの効果

第1章ではマウスにおける rhein anthrone の瀉下作用発現には結腸における PGE_2 の生成および放出促進が関与することを明らかにした。ラットにおいても rhein anthrone の瀉下作用発現に PG が関与するならば、indomethacin の前処置でマウス同様に瀉下作用は抑制されるはずである。そこで、Indomethacin を前処置して rhein anthrone の瀉下作用に及ぼす影響を調べた。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1章第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

第1章第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

第1章第1節と同様にして調製した。Indomethacin は Tween 80 1滴で懸濁し、10 ml/kg の投与量になるように精製水あるいは腹腔内投与する場合には生理食塩水で希釈した。

II. 実験動物

ラットは本章第1節と同様のものを用い、本章第1節と同様の盲腸内導管挿入手術を施した。

III. 瀉下試験

本章第1節と同様にして行った。

VI. 統計的評価

Cut off time を8時間として、得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で表わし、有意差は Mann-Whitney の U-検定を用いて検定した。

Table 13 Effect of indomethacin on rhein anthrone induced diarrhoea

Pretreatment	Incidence of diarrhoea	Mean diarrhoea score	Time to onset of diarrhoea mean \pm s.e.m.
None (control)	9/9	3.4 (n=9)	17.1 \pm 1.8
Indomethacin	10/10	3.4 (n=10)	60.1 \pm 9.8*

Occurrence of diarrhoea was observed for 8 h after rhein anthrone administration.

Indomethacin (10 mg/kg, i.p.) was given 90 min before rhein anthrone administration.

* $p < 0.001$ compared with the control group.

まず、マウスと同様に rhein anthrone 投与90分前に indomethacin 3 mg/kg を経口投与で前処置したが、rhein anthrone の瀉下作用は影響を受けなかった。indomethacin の投与量及び投与時間を検討した。Indomethacin を経口投与で、大量投与すると、消化管出血が認められたので、腹腔内投与で前処置することにした。Rhein anthrone 投与90分前に indomethacin 10 mg/kg を腹腔内投与した場合に、下痢発現が約40分遅延した。しかし、マウスとは異なり発現そのものは全く抑制されず、rhein anthrone 投与約60分後に全動

物に下痢が誘発され、下痢の強さも indomethacin 無処置群と同程度であった (Table 13)。この事実は indomethacin 前処置で rhein anthrone による下痢発現が完全に抑制されるマウスと瀉下作用機序が異なる可能性を示唆するものである。

第3節 大腸組織内PGE様物質生成に及ぼすrhein anthroneの効果

本章第2節で rhein anthrone の瀉下作用発現における PG の関与がマウスとラットでは異なる可能性が示唆されたが、ラットの盲腸内に rhein anthrone を投与し、下痢発現直後の大腸組織における PGE 様物質生成量を第1章第3節で記述したように各種阻害薬の存在下、摘出ラット胃底標本を用いた生物学的検定法¹⁶⁾²⁵⁾²⁶⁾で定量し、rhein anthrone の大腸組織内 PGE 様物質生成に及ぼす効果を調べた。

[実験方法]

第1章第3節と同様に行った。結腸組織から PGE 様物質を抽出するための溶媒は第1章第3節の倍量用いた。

[結果及び考察]

結果は Table 14 に示すように rhein anthrone 投与約20分後の瀉下作用発現時に結腸では PGE 様物質生成量は約4倍に増加したが、盲腸では有意な変化は認められなかった。試料投与90分前に indomethacin 10 mg/kg を腹腔内投与で前処置し、本来の rhein anthrone による瀉下作用発現の平均時間である投与20分後と、遅延して下痢が発現した時点で結腸組織内 PGE 様物質生成

量を定量した。

Table 14 Prostaglandin E-like material recovered from rat large intestine by the administration of rhein anthrone alone or after pretreatment with indomethacin

Pretreatment	Time ¹⁾ (min)	PGE-like material (ng PGE ₂ equivalent / g tissue) mean ± s.e.m.			
		Caecum		Colon	
		Vehicle	RA	Vehicle	RA
None (n=12)	20	5.1 ± 0.7	6.2 ± 0.9	4.2 ± 0.4	17.5 ± 2.0*
Indomethacin (n=9)	20 ²⁾	4.3 ± 0.4	5.4 ± 0.5 ⁺	2.7 ± 0.3 ⁺	3.3 ± 0.2 ⁺⁺
	60 ³⁾	5.6 ± 0.6	6.4 ± 0.9	3.2 ± 0.4	3.7 ± 0.2 ⁺⁺

Vehicle: 2 % NaHCO₃, RA: rhein anthrone

1) Time after rhein anthrone administration.

2) Diarrhoea did not yet appear.

3) Mean time to the delayed onset of diarrhoea after rhein anthrone administration.

* p < 0.001 compared with the vehicle group.

⁺ p < 0.01 and ⁺⁺ p < 0.001 compared with the respective groups without indomethacin.

その結果、indomethacin は vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液) 投与群の PGE 様物質生成をわずかではあるが、有意に抑制し、indomethacin に、生理的な PGE 様物質生成を抑制する作用が認められた。Rhein anthrone 投与群においては、rhein anthrone 投与20分後の下痢が発現していない時点では、rhein anthrone による結腸組織内 PGE 様物質生成促進は有意な抑制を受け、生成量 (ng PGE₂ 相当量/g 組織) は 17.5 から 3.3 へと著しく減少した。1.5 ng PGE₂ 相当量/g 組織に相当する生理的な PGE 様物質生成に対する抑制作用を差し引いても、rhein anthrone の PGE 様物質生成促進作用は indomethacin 前処置により 95 % 抑制されていると考えられる。この indomethacin による抑制効果は、rhein anthrone 投与約60分後に下痢が遅れて発現した時点においても持続しており、PGE 様物質生成促進は認められなかった。また、必須脂肪酸欠乏食で飼育したラットにおいてもセンナボッドエキスが下痢を誘発することから、センナによる下痢発現と PG 生成促進との関係を疑問視する報告³⁷⁾もある。

これらの知見は、ラット結腸における PGE 様物質の生成促進が瀉下作用発現に必須ではないことを示唆するものである。盲腸は rhein anthrone、indomethacin いずれによっても有意な影響を受けず、ラットにおける rhein anthrone の作用部位は、主として結腸であると考えられる。

第4節 大腸内輸送に及ぼす rhein anthrone 並びに indomethacin の効果

第1章で rhein anthrone のマウスにおける瀉下作用機序として大腸内輸送促進作用が明らかにされているところから、ラットについても大腸内輸送促進作用の有無を調べた。第1章と同様に rhein anthrone を盲腸内に投与した直後にマーカーを盲腸内に注入し、マーカーを含む着色便が最初に排泄されるま

での時間を測定した⁵⁾。マウスの場合にはマーカーとして BaSO₄ を用いたが、ラットにおいては BaSO₄ を用いた場合と同様の結果が得られ、着色便の排泄が観察しやすい carmine red をマーカーとして用いた。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1章第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

(1) carmine red (Merck)

その他のものは第1章第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

Carmine red は 5 mg/0.2 ml になるように精製水に溶解した。その他は第1章第1節及び本章第2節と同様にして調製した。

II. 実験動物

ラットは本章第1節と同様のものを用い、本章第1節と同様の盲腸内導管挿入手術を施した。

III. 大腸内輸送時間の測定⁵⁾

Rhein anthrone 又は vehicle である 2 % NaHCO₃ 溶液を盲腸内に投与した直後にマーカーとして carmine red 溶液 (5 mg/0.2 ml/匹) を導管より盲

腸内に注入し、carmine red の混じった赤色便が排泄されるまでの時間を測定した。赤色便排泄率は8時間以内の赤色便排泄動物数/全実験動物数で表わした。

VI. 統計的評価

Cut off time を8時間として得られた結果は平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差は Mann-Whitney の U-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

Rhein anthroneを投与すると赤色便は下痢を伴って約16分で排泄され、vehicle 投与群の440分に対し排泄時間の著しい短縮が認められた (Table 15)。

試料投与90分前に indomethacin 10 mg/kg を腹腔内投与で前処置すると 2 % NaHCO₃ (rhein anthroneのvehicle) 投与群では半数が8時間以内に赤色便を排泄せず、正常な大腸内輸送が抑制された。Rhein anthrone 投与群では排泄時間は16分から64分に有意に延長されたが、rhein anthrone の大腸内輸送促進作用は残存し、正常輸送の440分には回復せず、indomethacinの正常輸送に対する抑制効果を差し引くと rhein anthrone の大腸内輸送促進作用は 10 % 抑制されるに過ぎなかった。この輸送時間の延長は indomethacin による下痢発現の遅延に対応していると考えられる。したがって、rhein anthrone の大腸内輸送促進作用における PGE 様物質の関与は部分的であると推察される。しかし、indomethacin前処置によって正常輸送は著しく抑制されることから、局所におけるPG生成が結腸の蠕動及び輸送を媒介している可能性^{38) 39)} は考えられる。

Table 15 Effect of indomethacin on normal and rhein anthrone-stimulated large intestinal transit

Administration		Incidence of marker excretion	Transit time(min) mean \pm s.e.m.
First	Second		
Vehicle	Vehicle	9/9	440.7 \pm 20.8
Vehicle	Rhein anthrone	9/9	15.8 \pm 1.5*
Indomethacin	Vehicle	5/9	447.4 \pm 18.3
Indomethacin	Rhein anthrone	9/9	64.1 \pm 9.4**

Marker excretion was observed for 8 h after rhein anthrone administration

* $p < 0.01$ compared with the vehicle group.

** $p < 0.01$ compared with the rhein anthrone group without indomethacin.

第5節 結腸内腔液量及び結腸内 Na^+ 、 K^+ 膜輸送に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果

下痢発現のもう一つの要因として考えられる腸管内腔液の変化に及ぼすrhein anthroneの効果について、作用部位と推定される結腸において検討した。第1章第6節と同様に麻酔下、結腸内にrhein anthroneを含むTyrode液を

注入して両端を結紮し³²⁾、1時間後に内腔液を抜き取り、 PGE_2 放出、水、 Na^+ 、 K^+ 膜輸送に及ぼすrhein anthroneの効果調べた。

[実験方法]

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1章第1節と同様のものを用いた。

2. 試薬

第1章第1節、第2節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

第1章第1節及び本章第2節と同様にして調製した。

II. 実験動物

ラットは本章第1節と同様のものを用いた。

III. 結腸内腔液の測定

麻酔にはurethane (1.25 g/10 ml/kg)を用い、結腸内の洗浄には温生理食塩水20 mlを用いた。結腸内にはrhein anthrone (12.48 mg/2.5 ml/kg)又はvehicle (2% NaHCO_3 溶液 2.5 ml/kg)を含むTyrode液2 mlを注入した。結腸内腔液から PGE_2 を抽出するための溶媒は第1章第6節の倍量用いた。その他は第1章第6節と同様に行った。

VI. 統計的評価

得られた結果は平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差は Studentのt-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

Table 16 Effect of rhein anthrone on PGE₂ release into rat ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	PGE ₂ release (ng/g tissue)	
	Vehicle (2 % NaHCO ₃)	Rhein anthrone
Without indomethacin	2.74 ± 0.39 (n=8)	14.36 ± 1.72* (n=8)
With indomethacin	1.22 ± 0.20* (n=9)	4.13 ± 0.73*** (n=9)

* p < 0.001 compared with the respective vehicle groups.

* p < 0.01 and ** p < 0.001 compared with the respective groups without indomethacin.

Table 17 Effect of rhein anthrone on net water flux and electrolytes transport in rat ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	Net water flux (ml/g tissue)	Na ⁺ transport (μmol/g tissue)	K ⁺ transport (μmol/g tissue)
Without indomethacin			
Vehicle (n=20)	-0.30 ± 0.06	-127.63 ± 10.52	+9.46 ± 0.76
Rhein anthrone (n=20)	+0.67 ± 0.03*	-32.87 ± 12.98*	+24.05 ± 1.03*
With indomethacin			
Vehicle (n=20)	-0.61 ± 0.06**	-215.13 ± 12.16**	+15.82 ± 2.29*
Rhein anthrone (n=19)	+0.34 ± 0.05***	-80.32 ± 9.77***	+17.15 ± 1.36**

Vehicle: 2 % NaHCO₃

* p < 0.001 compared with the respective vehicle groups.

* p < 0.05 and ** p < 0.001 compared with the respective groups without indomethacin.

Table 16 に示すように、rhein anthrone は結腸管腔内への PGE_2 放出量を5倍に増加させ、有意な PGE_2 放出促進作用を示した。

試料投与の90分前に腹腔内投与で indomethacin 10 mg/kg を前処置すると、rhein anthrone 投与群では PGE_2 放出量が 14 ng/g 組織から 4 ng/g 組織へと有意に抑制されるとともに、vehicle 投与群においてもわずかながら有意に PGE_2 放出が抑制された。Indomethacin の vehicle 投与群に対する PGE_2 放出抑制は生理的な PGE_2 放出を抑制していると考えられるが、これを差し引いても rhein anthrone の結腸内 PGE_2 放出促進作用は indomethacin によって 75 % 抑制されると判断できる。

Vehicle 投与群では水輸送は吸収状態であるが、rhein anthrone はこの状態からむしろ分泌状態に逆転させた。試料投与90分前に indomethacin 10 mg/kg を腹腔内投与で前処置すると、vehicle (2 % NaHCO_3 溶液) 投与群、rhein anthrone 投与群双方において、有意な水吸収促進及び分泌抑制が認められた。しかし rhein anthrone による水分分泌促進状態を吸収状態まで戻すことはできなかった。Vehicle 投与群に対する indomethacin の水吸収促進は、生理的な水吸収を促進していると考えられる。Indomethacin のこの作用を差し引くと、rhein anthrone による水分分泌促進作用そのものは indomethacin によって、わずか 2 % 抑制されるに過ぎない。水分分泌抑制の大部分は indomethacin の正常な水吸収に対する促進効果の結果と推定できる (Table 17)。

また、rhein anthrone は Na^+ 吸収を抑制した。Indomethacin 前処置は vehicle 投与群 rhein anthrone 投与群、双方の Na^+ 吸収を促進した。Rhein anthrone の Na^+ 吸収抑制作用は indomethacin のこの生理的な Na^+ 吸収を促進する作用によって、阻害されたように見えただけであると考えられる (Table 17)。

K^+ 分泌は rhein anthrone により促進し、indomethacin 前処置によって抑

制された (Table 17)。Vehicle 投与群において K^+ 分泌が indomethacin 前処置によって促進した理由は不明である。

このように rhein anthrone の作用を indomethacin が部分的にしか抑制しない事実は、indomethacin が rhein anthrone の下痢を遅延させるだけで発現そのものは抑制しないことの1つの根拠と考えられる。

第6節 結腸内粘液分泌に及ぼすrhein anthrone並びにindomethacinの効果

Rhein anthrone のラットにおける下痢はマウスほど粘液性ではないが、この水様、粘液性の下痢が結腸内粘液分泌促進に起因している可能性はある。この点についてマウスと同様に検討した。

前節と同様に結腸内に rhein anthrone を注入して両端を結紮し³³⁾、1時間後に内腔液を取り出して、粘液量を総蛋白結合 hexose³⁵⁾ として定量した。

〔実験方法〕

I. 試料及び試薬

1. 試料

(1) rhein anthrone

第1章と同様のものを用いた。

2. 試薬

第1章第1節、第2節及び、第7節と同様のものを用いた。

3. 試料液などの調製

第1章第1節、第7節及び本章第2節と同様にして調製した。

II. 実験動物

ラットは本章第1節と同様のものを用いた。

III. 粘液分泌量の測定³⁵⁾

麻酔には urethane (1.25 g/kg) を用い、結腸内の洗浄には温生理食塩水 20 ml を用いた。結腸内には rhein anthrone (12.48 mg/ 2.5 ml/kg) 又は vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液 2.5 ml/kg) を含む Tyrode 液 2 ml を注入した。それ以外は第1章第7節に準じた。

VI. 統計的評価

得られた結果は平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差は Student の t-検定を用いて検定した。

[結果及び考察]

結果は Table 18 に示すとおりで、rhein anthrone は TPBH を7倍に増加させ、有意な粘液分泌促進作用を示した。試料投与90分前に indomethacin 10 mg/kg を腹腔内投与で前処置しても、vehicle (2 % NaHCO₃ 溶液) 投与群における粘液分泌にほとんど影響を及ぼさず、rhein anthrone の粘液分泌促進作用も 9 % しか抑制されなかった。

以上の結果は、rhein anthrone の粘液分泌促進作用に PG の介在の少ないことを示している。

Table 18 Effect of rhein anthrone on mucus secretion in rat ligated colon without and with pretreatment with indomethacin

	Mucus secretion (mg TPBH/g tissue)	
	Vehicle (2 % NaHCO ₃)	Rhein anthrone
Without indomethacin	0.24 ± 0.02 (n=14)	1.83 ± 0.07* (n=14)
With indomethacin	0.19 ± 0.01 (n=13)	1.63 ± 0.05** (n=14)

* p < 0.001 compared with the respective vehicle groups.

+ p < 0.05 compared with the rhein anthrone group without indomethacin.

第7節 小括

ラットにおいて、盲腸内投与した rhein anthrone は短時間で激しい下痢を誘発するが、マウスとは異なり PG 生合成阻害薬の indomethacin の前処置によって、下痢の発現が一時的に遅延するだけで発現そのものは阻止されず、その強さも弱まることはなかった。一方、rhein anthrone は結腸組織における PGE 様物質の生成を促進した。この促進は indomethacin の前処置により正常値レベルにまで抑制され、抑制状態は下痢が遅れて発現した時点でも持続していた。したがって、結腸における PGE 様物質生成促進が rhein anthrone による下痢発現に直接結びつくものではないと推論できる。さらに、rhein anthrone による結腸管腔内への PGE₂ 放出促進が indomethacin の前処置で 75 %

rone による結腸管腔内への PGE_2 放出促進が indomethacin の前処置で 75 % 抑制されるにもかかわらず、rhein anthrone の大腸内輸送促進作用、結腸内腔液貯留作用に対する indomethacin の抑制効果が小さいことから、これらの作用に PGE_2 は大きい寄与をしているとは考えられない。したがって、ラットでの rhein anthrone の瀉下作用発現において PG は主要なメディエーターではなく、他の作用機序の関与が重要であると結論される。ただ、PG は rhein anthrone の大腸内輸送促進作用に一部関与している可能性は考えられる。

第3章 総括

世界的に緩下剤として広く用いられているセンナ、大黃の瀉下作用の共通主成分である sennoside A の腸管内最終活性代謝物質である rhein anthrone の瀉下作用機序をマウス及びラットを用いて追究した。本研究では、rhein anthrone をその作用部位と考えられる大腸に直接投与することにより、作用部位を大腸に限定させ、PG の関与を中心にして検討を行った。

その結果、次の点が明らかになり、マウスとラットの間に種差が見いだされた。

1. マウスでは rhein anthrone の瀉下作用発現は indomethacin の前処置によって阻止されるのに対し、ラットでは約40分遅れて indomethacin 無処置群と同等の強さの下痢が rhein anthrone によって発現した。

2. PGE_2 (0.2 $\mu\text{g/kg}$) の盲腸内投与でマウスは瀉下作用が誘発されるのに対し、ラットでは 0.8 $\mu\text{g/kg}$ でさえ瀉下作用は誘発されなかった。

3. Rhein anthrone による下痢発現時の結腸組織内 PGE 様物質生成促進に対する indomethacin の抑制効果が、マウスの場合、瀉下作用の抑制と対応するのに対し、ラットでは、indomethacin によって PGE 様物質生成が抑制されていても下痢現象が誘発されることから、結腸組織内 PGE 様物質生成促進が瀉下作用発現に必須ではないことが明らかになった。

4. Rhein anthrone の大腸内輸送促進作用が indomethacin によってマウスでは対照とほぼ同程度にまで抑制されるが、ラットでは部分的には抑制されるものの対照と同程度にまでは回復しなかった。

5. 両端を結紮した結腸内において、rhein anthrone はマウスでは水吸収抑制作用は示すが、分泌を起こすことはなかった。ラットでは著しい吸収抑制のみならず分泌促進作用を示した。Indomethacin はいずれにおいても生理的な水吸収を促進するが、rhein anthrone の水吸収抑制ならびに分泌促進作用は実質上阻害しなかった。その結果、ラットでは水分泌促進が元の吸収状態には回復しなかった。

6. Rhein anthrone の結腸内粘液分泌促進作用が、indomethacin によってマウスでは抑制されるのに対し、ラットでは抑制されなかった。

以上、rhein anthrone はマウス及びラットにおいて一見類似した瀉下作用および結腸内 PGE_2 生成及び放出促進作用を起こす。しかし、その作用機序はマウスにおいては主として結腸内 PGE_2 生成及び放出促進を介した大腸内輸送促進、及び粘液生合成並びに分泌促進を中心とした結腸内腔液貯留であるのに対し、ラットにおいてはrhein anthrone の大腸内輸送促進作用、結腸内腔液貯留増大作用いずれにおいても PGE_2 の関与は小さく、種差の存在することが明らかになった。マウスとラットのような近縁の種間でもこのように作用機序が異なるというこれらの知見は、瀉下作用のメカニズムの多様性を示唆するとともに、アントラキノン類含有生薬の生物学的検定を行う場合の動物種選択の重要性を示していると考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究をまとめるに際し、御懇篤な御指導、ご鞭撻を賜りました京都大学薬学部 佐藤公道 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始直接の御指導と御鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部 桑野重昭 教授、山内和子 助教授に心より感謝の意を表します。

また、有益なご助言を賜りました京都大学薬学部 倉石 泰 助教授に深謝致します。

さらに、貴重なる prostaglandin E_2 モノクロナール抗体の御恵与ならびに prostaglandin E_2 の酵素免疫測定法を御指導いただきました徳島大学医学部 山本尚三 教授、林 陽子 博士、prostaglandin 類の生物学的検定法を御指導いただきました大阪府立大学農学部 矢ヶ崎 修 教授に深く感謝致します。

なお、実験の一部にご協力下さいました武庫川女子大学薬学部 宮脇良恵 助手、西川敦子 元助手、堀山志朱代 助手ならびに種々の御便宜をはかっていただきました武庫川女子大学薬学部生薬学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究の大部分は以下の論文に発表した。

1. T.Yagi, Y.Miyawaki, T.Nishikawa, K.Yamauchi and S.Kuwano, J.Pharm. Pharmacol., 40, 27-30(1988)
2. T.Yagi, Y.Miyawaki, A.Nishikawa, S.Horiyama, K.Yamauchi and S.Kuwano, J.Pharm.Pharmacol., 42, 542-545(1990)
3. T.Yagi, Y.Miyawaki, A.Nishikawa, K.Yamauchi and S.Kuwano, J.Pharm.Pharmacol., 43, 307-310(1991)
4. T.Yagi, A.Nishikawa, S.Horiyama, Y.Miyawaki, K.Yamauchi and S.Kuwano, Shoyakugaku-zasshi 掲載予定

1. K.Sasaki, K.Yamauchi and S.Kuwano, Planta Med., 37, 370-378(1979)
2. M.Dreessen, H.Eyssen and J.Lemli, J.Pharm.Pharmacol., 33, 679-681 (1981)
3. 桑野ら、未発表データ
4. J.D.Hardcastle and J.L.Wilkins, Gut, 11, 1038-1042(1970)
5. E.Leng-Peschlow, J.Pharm.Pharmacol., 38, 369-373(1986)
6. L.Lemmens, IRCS, 2, 1094(1974)
7. L.Lemmens and E.Borja, J.Pharm.Pharmacol., 28, 498-501(1976)
8. F.Awouters, C.J.E.Niemegeers, F.M.Lenaerts and P.A.Janssen, J.Pharm.Pharmacol., 30, 41-45(1978)
9. P.Vischer and J.Casals-Stenzel, J.Pharm.Pharmacol., 35, 152-156 (1983)
10. F.Capasso, N.Mascolo, G.Autore and M.R.Duraccio, Prostaglandins, 26, 557-562(1983)
11. G.Autore, F.Capasso and N.Mascolo, Br.J.Pharmacol., 81, 347-349 (1984)
12. E.Beubler and H.Juan, J.Pharm.Pharmacol., 31, 681-685(1979)
13. E.Beubler and H.Juan, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 305, 241-246(1978)
14. E.Beubler and G.Kollar, J.Pharm.Pharmacol., 37, 248-251(1985)
15. M.M.Cohen, Prostaglandins Leukotriens and Med., 8, 389-397(1982)
16. F.Capasso, N.Mascolo, G.Autore and V.Romano, J.Pharm. Pharmacol., 38, 627-629(1986)

17. 上田元彦、松田三郎、川上勝、峰下鉄雄、武田寛、応用薬理、3, 265-269 (1969)
18. H. Auterhoff and F. C. Scherff, Arch. Pharm., 293/65, 918-925 (1960)
19. E. Struyf and E. H. C. Verhaeren, Planta Med., 28, 382-388 (1975)
20. J. Lemli and J. Cuveele, Planta Med., 26, 193-195 (1974)
21. N. S. Doherty, Br. J. Pharmacol., 73, 549-554 (1981)
22. J. H. Sanner, Arch. int. pharmacodyn., 180, 46-56 (1969)
23. A. Bennett and J. Posner, Br. J. Pharmacol., 42, 584-594 (1971)
24. K. E. Eakins, S. M. M. Karim and J. D. Miller, Br. J. Pharmacol., 39, 556-563 (1970)
25. J. R. Vane, Br. J. Pharmacol., 12, 344-349 (1957)
26. O. Yagasaki, M. Takai and I. Yanagiya, Japan J. Pharmacol., 30, 853-860 (1980)
27. E. Granström and B. Samuelsson, In: J. C. Frölich (Ed), Advance in Prostaglandin and Thromboxane Research vol. 5, Raven Press, New York pp. 1-13 (1978)
28. H. R. Knapp, O. Oelz and B. J. Sweetman, Prostaglandins, 15, 751-757 (1978)
29. K. Kiyomiya and S. Oh-ishi, Japan J. Pharmacol., 39, 201-206 (1985)
30. N. S. Doherty, T. H. Beaver, K. Y. Chan, J. E. Coutant and G. L. Westrich Br. J. Pharmacol., 91, 39-47 (1987)
31. K. Gréen, Chem. Phys. Lipids, 3, 254-272 (1969)
32. E. Beubler, In the discussion of N. Mascolo, R. Meli, G. Autore and F. Capasso, Pharmacology, 36 (suppl. 1), 97 (1988)

33. W. Forth, W. Rummel, J. Baldauf, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak u. exp. Path., 254, 18-32 (1966)
34. F. Shono, K. Yokota, K. Horie, S. Yamamoto, K. Yamashita, K. Watanabe and H. Miyazaki, Analytical Biochemistry, 168, 284-291 (1988)
35. R. J. Winzler, In: D. Glick (Ed), Methods of Biochemical Analysis vol. 2, Interscience Inc New York, pp. 279-311 (1955)
36. U. M. Farack, E. Gruber and K. Loeschke, Eur. J. Pharmacol., 117, 215-222 (1985)
37. N. Mascolo, R. Meri, G. Autore and F. Capasso, J. Pharm. Pharmacol., 40, 882-884 (1988)
38. A. Bennett, K. G. Eley and H. L. Stockley, Br. J. Pharmacol., 57, 335-340 (1976)
39. G. Staumont, J. Fioramonti, J. Frexinos and L. Bueno, Gut, 29, 1180 - 1187 (1988)